

ホヤ喘息における粗抗原および各種精製抗原と 試験管内ヒスタミン遊離との関係

岩手医科大学内科学第三講座

谷藤一生 大坊 中 須藤守夫 田村昌士

県立広島病院第三内科

城 智彦

広島県立廿日市町

勝谷 隆

広島大学工学部生物化学

岡 智 鈴木秀規

Key words: histamine — histamine release — sea-squirt asthma —
sea-squirt antigen

(受付: 11月19日, 1983)

緒 言

対 象

ホヤ喘息はカキの養殖従業者に発生する典型的な I 型アレルギーによる職業性気管支喘息である。岡、城ら^{1)~3)}はホヤ抗原を化学的、免疫学的手技により精製し、精製抗原 D, Gi-rep, EiM を分離している。ホヤ精製抗原 D は皮内反応、粘膜反応ともに陽性を示す³⁾。一方, Gi-rep, EiM は皮内反応陽性、粘膜反応陰性であり、減感作療法に用いられて著効を得ている^{4)~6)}。ホヤ抗原の抗原性の検索は、皮内反応、皮内反応閾値、吸入誘発試験、RAST 法により行われてきたが、抗原添加による試験管内ヒスタミン遊離についてはまだ報告されていない。試験管内ヒスタミン遊離試験は、原因抗原によって末梢血好塩基球から遊離したヒスタミンを生化学的に測定できる。しかしヒスタミン遊離率と RAST 値の相関関係の有無については必ずしも有意の一致をみていない^{7)~9)}。

著者らは、試験管内ヒスタミン遊離試験においてホヤ粗抗原、ホヤ精製抗原 D, Gi-rep, EiM がヒスタミンをどの程度遊離するか、遊離するヒスタミン量は、添加するホヤ抗原濃度に比例するか、さらには各ホヤ抗原間でヒスタミン遊離に差があるか否かについて検討した。

ホヤ喘息患者12例(男1例, 女11例)を対象とした。年齢は33才より72才まで(平均52.7才)であり、減感作療法施行期間は1年から8年間(平均3.6年)である。減感作療法に用いた抗原は、精製抗原 Gi-rep 5例, EiM 7例である。

方 法

1) 添加抗原濃度

ホヤ粗抗原液は20倍液(島居薬品, PN 量13.7 μ g/ml)から 10^6 倍液まで、ホヤ精製抗原(D, Gi-rep, EiM)はそれぞれ 10^2 倍(10mg/ml)から 10^6 倍液までの各濃度の抗原液を添加に用いた。

2) 検体の処理

採血は heparin 処理した注射器で肘静脈より静かに行い, polyethylene tube に移したのち静かに転倒混和した。

3) 全血法による試験管ヒスタミン遊離試験¹⁰⁾

Hank's BSS (千葉県血清研究所製) 1.5ml を入れた試験管に、1)に示した各種ホヤ抗原液を濃度別に0.05 ml と対照として生理的食塩液0.05ml を添加し、37℃ 10分間 preincubate した。これに heparin 処理した血液 1ml を各反応液中に加え、37℃で30分間 incubate

Abbreviations: Hank's BSS Hank's balanced salt solution; RAST radioallergosorbent test; PN protein nitrogen

したのち、750×gで10分間遠沈した。えられた上清1.5 mlに1N HClO₄ 1mlを加え、25000×gで30分間遠沈して除蛋白し、その上清部分のヒスタミンを測定した。抗原添加血液の上清ヒスタミン値から対照とした生理食塩液添加血液の上清ヒスタミン値を引いた値を遊離ヒスタミン値とした。

全血ヒスタミン値の測定は、Hank's BSS 1.5mlを入れた試験管に生理食塩液0.05mlを添加し37℃で10分間 preincubate し、これに heparin 処理した血液や1 mlを反応液の中に加え、37℃ 30分間 incubate し、その後ただちに-40℃に凍結し、ついで溶解させたのち測定した。なおヒスタミン遊離率は、全血ヒスタミン値に対する遊離ヒスタミン値の百分率として下記より求めた。

$$\frac{\text{遊離ヒスタミン量} - \text{blank 量} - \text{対照遊離ヒスタミン量}}{\text{全血ヒスタミン量} - \text{blank 量}} \times 100$$

4) ヒスタミンの抽出および測定

ヒスタミンの抽出および測定は小松による Shoreらの改良法¹²⁾を用いて行った。

成 績

I. 各種ホヤ抗原各濃度添加によるヒスタミン遊離量(表1)

1) ホヤ粗抗原、精製抗原 D, Gi-rep によるヒスタミン遊離量は、ホヤ粗抗原20倍液で34.0±8.1ng/ml, ホヤ精製抗原 D 10² 倍液で18.5±5.5ng/ml, Gi-rep 10² 倍液で31.8±9.1ng/ml と最大のヒスタミン遊離を示し、おのおのの抗原を希釈するにしたがいヒスタミン遊離量の減少を認めた。

2) ホヤ精製抗原 EiM によるヒスタミン遊離量は、10³ 倍液で35.6±11.7ng/ml と最大のヒスタミン遊離を示した。10² 倍液ではヒスタミン遊離量はやや低値

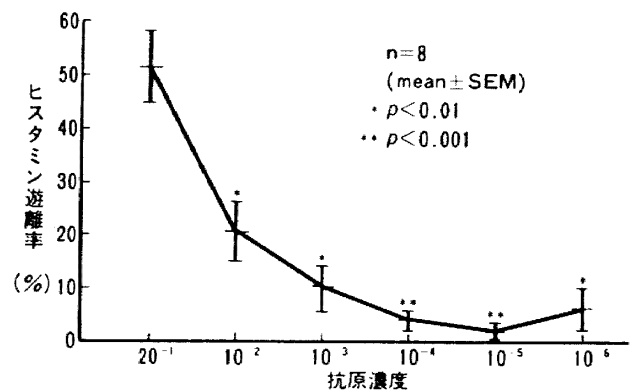


図1. ホヤ粗抗原によるヒスタミン遊離率

を示したが、その差は僅少で10³ 倍液と有意差はない。10³ 倍液以下では抗原を希釈するにしたがいヒスタミン遊離量は減少を示した。

II. 各種ホヤ抗原添加による試験管内ヒスタミン遊離率

1) ホヤ粗抗原添加によるヒスタミン遊離率(図1)

ヒスタミン遊離率は、20倍液で51.4±6.8%, 10² 倍液で20.7±5.6%, 10³ 倍液で10.3±3.9%, 10⁴ 倍液で4.0±1.6%, 10⁵ 倍液で2.1±1.4%, 10⁶ 倍液で6.3±4.1%であった。ヒスタミン遊離率は20倍液に比べ10² 倍液以下で有意の低値を示した。20倍液で最大の遊離率を示し、添加する抗原を希釈するにしたがいヒスタミン遊離率は低下した。

2) ホヤ精製抗原 D 添加によるヒスタミン遊離率(図2)

ヒスタミン遊離率は、10² 倍液で46.9±6.3%, 10³ 倍液で39.1±7.8%, 10⁴ 倍液で25.1±4.3%, 10⁵ 倍液で7.2±2.7%, 10⁶ 倍液で3.7±2.1%であった。10² 倍液に比べて10³ 倍液以下で有意の低値を示した。10² 倍液で最大の遊離を示し、添加する抗原を希釈するにしたがいヒスタミン遊離率は低下した。

3) ホヤ精製抗原 Gi-rep 添加によるヒスタミン遊離率(図3)

表1 全血ヒスタミン値およびヒスタミン遊離量

添加抗原	例数	全血ヒスタミン値	ヒスタミン遊離量					
			抗原希釈濃度					
			20倍	10 ² 倍	10 ³ 倍	10 ⁴ 倍	10 ⁵ 倍	10 ⁶ 倍
粗抗原	8	71.7±25.1	34.0±8.1	17.1±6.7***	5.7±1.5**	2.6±0.8***	1.2±0.6***	2.8±1.4**
精製抗原	D	38.0±8.9		18.5±5.5	15.8±5.4**	9.9±2.7*	2.2±0.9**	0.8±0.4*
	Gi-rep	68.8±14.3		31.8±9.1	15.6±6.2***	4.9±1.2*	1.2±1.0*	1.6±0.8*
	EiM	68.7±26.0		33.2±10.4	35.6±11.7	25.8±10.2	7.7±2.0*	3.8±1.9*

* p<0.05 ** p<0.02 *** p<0.01 meam±SEM(ng/ml)

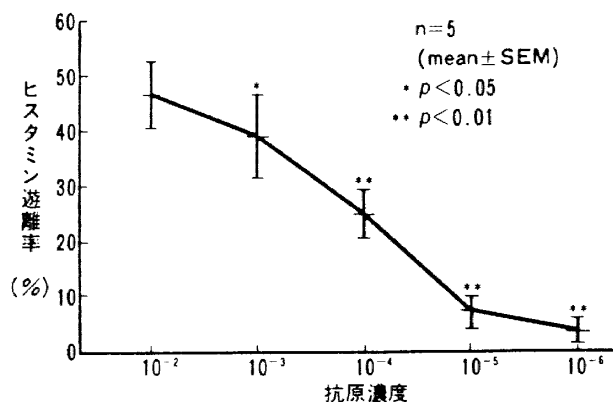


図2. ホヤ精製抗原Dによるヒスタミン遊離率.

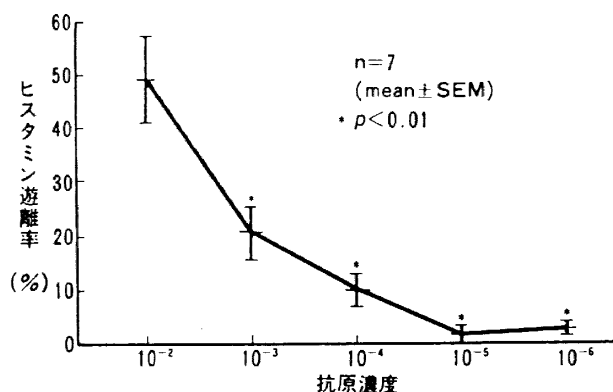


図3. ホヤ精製抗原 Gi-rep によるヒスタミン遊離率.

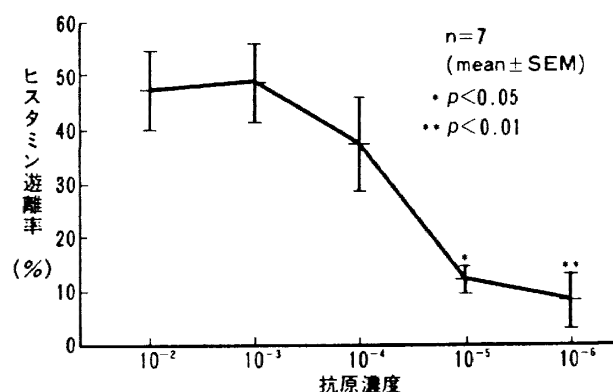


図4. ホヤ精製抗原 EiM によるヒスタミン遊離率.

ヒスタミン遊離率は 10^2 倍液で $49.6 \pm 8.0\%$, 10^3 倍液で $20.7 \pm 5.0\%$, 10^4 倍液で $10.3 \pm 2.9\%$, 10^5 倍液で $1.7 \pm 1.4\%$, 10^6 倍液で $2.7 \pm 1.4\%$ であった。 10^2 倍液に比べて 10^3 倍液以下で有意の低値を示した。 10^2 倍液で最大の遊離を示し、添加する抗原を希釈するにしたがいヒスタミン遊離率は低下した。

4) ホヤ精製抗原 EiM 添加によるヒスタミン遊離率 (図4)

ヒスタミン遊離率は, 10^2 倍液で $47.2 \pm 7.2\%$, 10^3 倍液で $48.2 \pm 7.2\%$, 10^4 倍液で $37.5 \pm 8.9\%$, 10^5 倍液で $12.4 \pm 3.2\%$, 10^6 倍液で $8.2 \pm 5.0\%$ であった。 10^2 倍液に比べて 10^5 倍液, 10^6 倍液で有意の低値を示した。 10^3 倍液で最大の遊離を示しているが, 10^2 倍液と 10^3 倍液とではほとんど差を認めない。 10^4 倍液以下では抗原を希釈するにしたがいヒスタミン遊離率は低下した。

考 察

気管支喘息の原因抗原を *in vitro* で検索する方法として、従来 RAST, 好塩基球脱顆粒試験および試験管内ヒスタミン遊離試験が行われている。1941年, Katz and Cohen¹³⁾はブタクサ過敏症患者のヒト白血球にブタクサ抗原を添加するとヒスタミンが遊離されることを証明して以来、ヒスタミン遊離に関する数多くの研究がなされ、現在では試験管内ヒスタミン遊離試験はアレルギー性疾患における有力な検査法の一つとなっている。試験管内ヒスタミン遊離試験には全血法⁸⁾¹³⁾¹⁴⁾と白血球法¹⁵⁾¹⁶⁾がある。全血法は白血球法より使用する血液が少なく、また白血球を分離する手技が省略でき、とくに小松による Shore¹¹⁾の改良法¹²⁾を用いれば、白血球法に比べて約1/5から1/20の採血ですむ。したがって、今回のように同一患者で多くの血液を必要とする場合には全血法が適している。

一方、試験管内ヒスタミン遊離試験で添加するホヤ抗原は、従来 Dextrose-Phenol 法により作製された粗抗原のほかに、岡, 城ら^{1)~3)}により精製された精製抗原 D, Gi-rep, EiM がある。分子量はDが 1×10^4 , Gi-repが 1.1×10^5 , EiMが 23×10^4 であり、D, Gi-rep, EiMはホヤ喘息患者に対し高い皮膚反応活性を示す。粘膜反応活性はDにはあるが、Gi-rep, EiMにはない³⁾。減感作療法におけるIgG抗体の産生はEiM, 次いでGi-repで著明であり、Dではより少ないと報告されている³⁾⁶⁾。

著者らは、ホヤ喘息患者においてホヤ粗抗原、精製抗原 D, Gi-rep, EiM を添加した場合のヒスタミン遊離およびその dose dependent の有無について検討した。最大のヒスタミン遊離はホヤ粗抗原、精製抗原 D, Gi-rep および EiM においては、それぞれ20倍液, 10^2 倍液, 10^2 倍液, 10^3 倍液であり、それ以下の抗原濃度になるにしたがい減少した。EiM では 10^2 倍液と 10^3 倍液ではほぼ同程度の遊離を示した。田原¹⁷⁾は室内塵抗原

を用いたヒスタミン遊離試験において、一定濃度以上の抗原を添加することがヒスタミン遊離には必要であると述べているが、著者らの成績からみても 10^5 倍以下の濃度ではすべての抗原においてヒスタミン遊離は微量であった。通常、室内塵、舞粉抗原、ブタクサ抗原を添加した場合のヒスタミン遊離試験では、抗原濃度を増すと、ある濃度でヒスタミン遊離率は最高値に達するが、さらに抗原濃度を増すとかえって遊離率は低下するといわれている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。EiMをのぞく3種のホヤ抗原では濃度を増すと最高値を示していたが、それ以上の濃度に関しては、ホヤ抽出液を10倍、100倍に濃縮して検討するだけの抗原量が得られないため検索することができなかった。しかし著者らの成績ではEiMによるヒスタミン遊離率は 10^3 倍液で最高値を示したことから、 10^2 倍液以上の抗原濃度で試験管内ヒスタミン遊離試験を行えばヒスタミン遊離率が低下する可能性もある。

ホヤ抗原の濃度は、粗抗原では蛋白窒素量あたりで表現され、精製抗原は酸性ムコ多糖蛋白複合体として抗原の絶対量で表現されている。したがって精製抗原間では同一濃度で比較することができるが、粗抗原間では同一濃度で論じることができない。しかしながら著者らの成績では、粗抗原、精製抗原ともほぼ同様のヒスタミン遊離を示した。

ホヤ抗原によるヒスタミン遊離試験は粘膜反応活性と一致している。したがって粗抗原、精製抗原D, Gi-rep, EiMにはヒスタミン遊離をおこす因子が含まれており、これは皮内反応活性を示す因子と同一のものと思われる。

結 語

ホヤ喘息患者においてホヤ粗抗原、精製抗原D, Gi-rep, EiM添加による試験管内ヒスタミン遊離試験を行い、以下の結果を得た。

ホヤ粗抗原、精製抗原D, Gi-repによるヒスタミン遊離率は、最も高い添加抗原濃度、それぞれ20倍液、 10^2 倍液で増大となり、添加する抗原を希釈するにしたがい低下した。ホヤ精製抗原EiMによるヒスタミン遊離率は、 10^3 倍液で最大であり、 10^2 倍液と 10^3 倍液の間でほとんど差を認めず、 10^3 倍液以下では添加する抗原を希釈するにしたがい低下した。また各種ホヤ抗原添加における最大ヒスタミン遊離率は、ほぼ同程度で

あった。

以上の結果から、各種ホヤ抗原によるヒスタミン遊離は添加する抗原濃度に比例することが判明した。

本論文の要旨の一部は第31回日本アレルギー学会総会および第11回国際アレルギー学会議にて発表した。

文 献

- 1) Oka, S., Suzuki, H., Hashimoto, H. and Jyo, T.: Properties of two sea-squirt antigens. *J. Biochim.* 91, 247-255, 1982.
- 2) Oka, S., Suzuki, H., Jyo, T. and Tsuji, M.: Purification of two types of sea-squirt antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 59, 408-419, 1979.
- 3) 城 智彦: 特殊アレルギーによる減感作, ホヤ喘息を中心にして, “減感作療法の基礎と臨床”, 中外医学社, 東京, pp.208-225, 1982.
- 4) 城 智彦, 河本寛爾, 坪井信治, 勝谷 隆, 大塚正, 岡 智: 気管支喘息における感作と減感作の機序に関する研究, アレルギー 23, 464-474, 1974.
- 5) 城 智彦, 河本寛爾, 桑原正雄, 小泊好幸, 勝谷隆, 大塚 正, 坪井信治: 気管支喘息の長期減感作例における特異的IgG抗体産生の意義について, 日胸疾会誌 19, 223-229, 1981.
- 6) 城 智彦, 桑原正雄, 小泊好幸, 勝谷 隆, 岡智, 鈴木秀規, 大塚 正, 坪井信治: 著効例よりみた気管支喘息減感作療法の奏効機序について, アレルギーの臨床 21, 60-63, 1983.
- 7) Foucard, T.: Immunochemical and biological determination of reagins. A comparison between the radioallergosorbent test (RAST) and the test for histamine release from passively sensitized chopped human lung (CHLT). *Int. Arch. Allergy* 42, 711-721, 1972.
- 8) 原田恒男: 気管支喘息における室内塵抗原による試験管内ヒスタミン遊離試験に関する臨床的研究, 日気食会報 32, 301-309, 1981.
- 9) Evans, R., Reisman, R.E., Wypych, J.I. and Arbesman, C.E.: An immunologic evaluation of ragweed sensitive patients by newer techniques. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 285-291, 1972.
- 10) 小松道俊: ヒスタミン遊離試験, “アレルギークリニック (光井庄太郎編)”, 金原出版, 東京, pp. 154-158, 1979.

- 11) Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H. Jr.: A method for the fluometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 127, 182-186, 1959.
- 12) 小松道俊: 気管支喘息における histamine に関する研究 第1報 histamine の測定(蛍光法)に対する基礎的検討とその応用. *アレルギー* 27, 67-74, 1978.
- 13) Katz, G. and Cohen, S.: Experimental evidence for histamine release in allergy. *J.A.M.A.* 117, 1782-1983, 1941.
- 14) 齊藤 紘: 気管支喘息における試験管内ヒスタミン遊離試験に関する研究. *アレルギー* 22, 745-756, 1973.
- 15) 齊藤 紘, 原田恒男, 須藤守夫, 光井庄太郎: HS66T のヒト白血球よりのヒスタミン遊離抑制作用ならびに各種アレルギー性疾患における臨床効果についての検討. *日気食会報* 31, 40-45, 1980.
- 16) 富田有祐, 塩田浩政, 三島 健: 好塩基球, マスト細胞からのヒスタミン遊離. *臨床免疫* 6, 730-738, 1974.
- 17) 田原 実: 気管支喘息における血中ヒスタミン値の動態と白血球ヒスタミン遊離に関する研究. *アレルギー* 23, 798-808, 1974.
- 18) 黒沢元博, 根本俊和, 田中哲治, 笛木隆三, 小林節雄: 気管支喘息患者末梢白血球からのヒスタミン遊離試験と臨床的意義に関する検討. *臨床免疫* 14, 119-126, 1982.
- 19) 黒沢元博, 根本俊和, 田中哲治, 笛木隆三, 小林節雄, 柳原行雄, 信太隆夫: こんにゃく喘息患者末梢白血球からのヒスタミン遊離試験と臨床的意義に関する検討. *アレルギー* 30, 151-159, 1981.
- 20) Ishizaka, T., Ishizaka, K., Johansson, S.G.O. and Bennich, H.: Histamine release from human leukocytes by anti- γ E antibodies. *J. Immunol.* 102, 884-892, 1969.

THE CORRELATION BETWEEN SEA-SQUIRT CRUDE AND PURIFIED ANTIGENS AND HISTAMINE RELEASE IN SEA-SQUIRT ASTHMA

Kazuo Tanifuji, Ataru Daibo, Morio Sudo and Masao Tamura

The Third Department of Internal Medicine, Iwate Medical University, School of Medicine

Toshihiko Jyo

The Third of Internal Medicine, Hiroshima Prefectural Hiroshima Hospital

Takashi Katsutani

Hatsukaichi-machi, Hiroshima-Ken

Satoru Oka and Hidenori Suzuki

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

In vitro histamine release tests with four types of the sea-squirt antigens were performed in a patient with sea-squirt asthma. These antigens were the crude antigen and the three purified types of antigens, D (molecular weight of 10,000), Gi-rep (110,000) and EiM (23,000). The results were as follows;

Maximal histamine release with crude antigen, purified D antigen and Gi-rep antigen was observed at concentrations of 20 , 10^2 and 10^3 , respectively. The percent of histamine release after challenge with crude, D and Gi-rep antigens decreased in proportion to the dilution of antigen. Maximal histamine release with EiM antigen was observed at the concentration of 10^2 , but the percent of histamine release was not different at concentrations of 10^2 and 10^3 , and decreased in proportion to the dilution of antigen. It was shown that the histamine release with the four types of the sea-squirt antigens was proportional to the concentration of these antigens.